INSTITUT FÜR BLUTGERINNUNGSWESEN UND TRANSFUSIONSMEDIZIN DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF
DIREKTOR: PROF. DR. H. TH. BRÜSTER

EINE AUTOMATISIERTE BESTIMMUNG DES PLASMINOGENS IM MENSCHLICHEN PLASMA MITTELS CHROMOGENER PEPTIDSUBSTRATE

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG EINES DOKTORS DER MEDIZIN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

VORGELEGT VON

LUCIEN C. OLIVIER

1984

Institut für Blutgerinnungswesen
und Transfusionsmedizin der
Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H.Th. Brüster

Eine automatisierte Bestimmung des Plasminogens im menschlichen Plasma mittels chromogener Peptidsubstrate.

Dissertation
zur Erlangung eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Lucien C. O l i v i e r

1 9 8 4

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. H.Th. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. Trobisch

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Königshausen

Inhaltsverzeichnis

1.0 Einleitung

2.1 Plasminogen

2.2 Plasmin

2.3 Streptokinase

2.4 Nachweismethoden für Plasminogen im menschlichen Plasma

2.5 Probleme der Proteasenaktivitätsbestimmung mit Hilfe Chromogener Peptidsubstrate am Beispiel des S225I

3.0 Materialien

4.0 Methoden

5.0 Ergebnisse

5.1 ph-Optimum der Reaktion

5.2 Optimale Streptokinasekonzentration im Inkubationsansatz

5.3 Inkubationszeit, Temperaturabhängigkeit und Stabilität der Ansätze

5.4 Michaelis-Menten-Konstante für den Plasminogen-Streptokinase-Komplex (Plg-Sk-Komplex)

5.5 Linearität in der Meßzeit

5.6 Linearitätsbereich der Extinktionsänderungen für verschiedene Normalplasmaverdünnungen

5.7 Vergleichende Messungen an 60 Plasmen gesunder männlicher Spender mit Hilfe der chromogenen Methode und der Radialen Immundiffusion

5.8 Auswertung der 12 vergleichenden Messungen an 60 Spenderplasmen

6.0 Diskussion

7.0 Zusammenfassung

8.0 Literaturverzeichnis

1.0 Einleitung

Das im RES synthetisierte Zymogen Plasminogen liegt aufgrund quantitativer proteinchemischer Bestimmungen im Plasma des Menschen in einer Konzentration von 10 - 20 mg pro 100 ml vor.
Eine Reihe von im Plasma befindlichen Aktivatoren, aber auch zellständige oder von Zellen sezernierte Aktivatoren sind in der Lage, das im Plasma kursierende Zymogen Plasminogen in die proteolytisch aktive Ringprotease Plasmin zu überführen. Diese stärkste Protease des menschlichen Plasmas spaltet neben Fibrin und Fibrinogen auch die Gerinnungsfaktoren V, VIII und möglicherweise XIII sowie Immunglobuline. Der Mechanismus der Fibrinolyse durch Plasmin ist weitgehend aufgeklärt. Die hierbei entstehenden Spaltprodukte werden entsprechend ihrer molekularen Massen mit X, Y, D und E bezeichnet. Neben den physiologischen Aktivatoren des Plasminogens kann das menschliche Zymogen durch das Streptokokkenexotoxin Streptokinase in einer zweiphasischen Reaktion aktiviert werden. Bei diesem Vorgang vereinigt sich jeweils ein Molekül Plasminogen mit einem Molekül Streptokinase unter Bildung eines äquimolaren Komplexes. In der folgenden Konformationsänderung wird das Plasminogenmolekül gespalten und in Kooperation mit dem Streptokinasemolekül entsteht ein enzymatisch aktives Zentrum, das imstande ist weitere Plasminogenmoleküle, die nicht mit Streptokinase komplexiert sind, zum eigentlichen Plasmin zu aktivieren. Der Streptokinase-Plasminogen-Komplex (Sk-Plg-Komplex) kann seinerseits ausschließlich Plasminogenmoleküle zum Plasmin aktivieren; große Moleküle wie Fibrinogen und Fibrin werden durch den Komplex nicht

gespalten. Eine schnelle Orientierung über den Plasminogengehalt eines Patientenplasmas ist bei einer Reihe verschiedener Erkrankungen von außerordentlichem klinischen Interesse. Besonders bei der Verlaufskontrolle einer systemischen Streptokinasetherapie z.B. im Akutstadium eines Myocardinfarktes oder anderer thrombembolischer Prozesse kann die Abnahme des Plasminogenspiegels im Patientenplasma und dessen fortlaufende Beobachtung für die Dosierung des eingesetzten Fibrinolytikums zentrale Bedeutung erlangen.
Bei diesen Thrombolysen mit massiver, kontinuierlicher Streptokinaseinstillation bedeutet eine zunehmende therapiebedingte Plasminogenabnahme nach anfänglicher Plasminämie eine immer größer werdende Verschiebung des molaren Verhältnisses von Plasminogen zu Streptokinase zugunsten des Aktivators. Durch diesen Vorgang nimmt, wie bereits erwähnt, die Bildung des proteolytisch inaktiven Plasminogen-Streptokinase-Komplexes zu und der gewünschte Therapieeffekt, nämlich die Lyse des pathogenen Thrombus, ab. Grundsätzlich ist auch eine Überwachung der Streptokinasetherapie z.B. mit Hilfe der Plasmathrombinzeit möglich. Hier wird jedoch die therapeutisch induzierte Plasminwirkung indirekt über die verzögerte Fibrinbildung bestimmt; ein Vorgang, der im Rahmen der notfallmäßigen Polytherapie z.B. durch Heparingaben entscheidend mitbeeinflußt wird. Eine Plasminogenbestimmung kann hier zu einer rationelleren Dosierung der Streptokinase beitragen.
Aber auch bei Lebererkrankungen und bei der Abklärung bestehender Hyperfibrinolysen kann der Kliniker eine Verlaufskontrolle des Plasminogens im Patientenplasma verlangen.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Methoden zur Plasminogenbestimmung zeichnen sich in der Regel durch hohe Arbeitsintensivität bei teilweiser geringer Spezifität oder schlechter Reproduzierbarkeit aus.
Es war daher das Bestreben unserer Arbeitsgruppe, eine Methode zu entwickeln, die eine hohe Spezifität, gute Reproduzierbarkeit, sowie eine einfache Handhabung bietet. Durch den simultan durchgeführten Vergleich mit der als Referenzmethode gewählten Radialen Immundiffusion wird die Richtigkeit der Methode geprüft.

2.1 Plasminogen

Plasminogen ist das zentrale Protein der Fibrinolyse. Es besitzt keine eigene lytische Aktivität, sondern stellt stellt die inaktive Vorstufe des Plasmin dar. In der Literatur sind verschiedene Synonyma für das Plasminogen in Gebrauch wie: Profibrinolysin, Prolysin, Tryptogen oder lytic factor. Mit einem Molekulargewicht von durchschnittlich 90.000 kann das Zymogen Plasminogen aus dem Plasma, Serum oder angereicherten Fraktionen mit Hilfe der Affinitätschromatographie (an z.B. L-Lysin-substituiertem Sepharosegel) isoliert werden.

Plasminogen wird im RES der Leber, aber auch z.B. in den Tubulusepithelien der Niere synthetisiert. In der Plasmaeiweißelektrophorese wandert das mit einem Kohlenhydratanteil von 1,5 % zu den Glykoproteiden zu zählende Molekül in der beta-Globulinfraktion. Es ist durch Ammoniumsulfat aussalzbar und kann in der Cohn-Fraktion III angereichert werden. Plasminogen ist nicht dialysierbar und relativ hitzestabil. D.h. es widersteht 56°C

länger als 30 min. und zeigt erst bei 70° C allmähliche Inaktivierung. In Aqua dest. ist Plasminogen praktisch unlöslich und geht erst beim Zusatz von NaCl in einen gepufferten Milieu in Lösung.

Die Aminosäurestruktur und die räumliche Anordnung des Plasminogens gilt heute als aufgeklärt, sodaß man 4 Teilsequenzen A - D im einkettigen Zymogen unterscheidet. In der Literatur werden in Abhängigkeit von der gewählten Bestimmungsmethode sehr unterschiedliche Normalwerte für Plasminogen im menschlichen Plasma angegeben, und zwar mit 12-20 mg/100 ml bzw. 1,4-2,4 µmol/l.

Seine physiologische Aufgabe - die Fibrinolyse - erfüllt das Plasminogen erst nach vorheriger limitierter Proteolyse durch endogene zelluläre und plasmatische Aktivatoren, aber auch durch Kontamination mit sogenannten Fibrinolysokinasen wie z.B. der Streptokinase oder der Staphylokinase. Auch Chloroform und Plasmaverdünnungen bewirken durch Inaktivation vorliegender Antiplasmine eine plasmininduzierte Fibrinolyse. Analog zur Gerinnungskaskade unterscheidet man im Fibrinolysesystem eine endogene und exogene Aktivation:

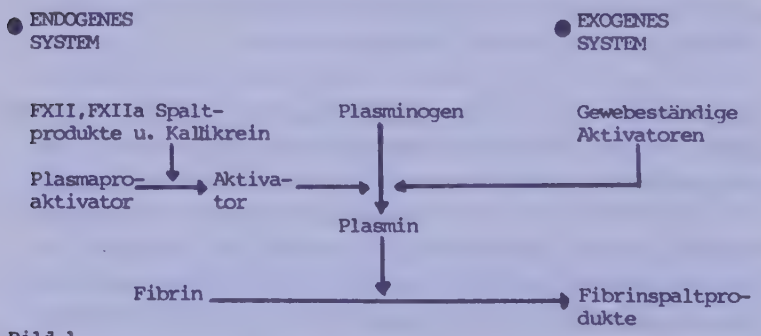


Bild 1

Ziel beider Systeme ist die Freisetzung von Plasmin, dessen physiologisches Substrat das Fibrin ist.

2.2 Plasmin

Durch die Aktivierung des Proenzyms entsteht aus dem einkettigen Plasminogen das nunmehr komplett gefaltete Plasmin - eine Ringprotease. Verwendete Synonyma sind: Fibrinolysin, Lysin und Tryptase. Im aktiven Zentrum dieser Ringprotease befindet sich neben Histidin ein aktivierter Serinrest, der polarisiert durch eine Hydroxygruppe die nucleophilen und damit lytischen Eigenschaften des Plasmin auf Peptidbindungen begründet. Bevorzugt spaltet das Plasmin Lysyl-Lysin- und Lysyl-Argininbindungen. Die synonyme Bezeichnung Fibrinolysin wird der ungerichteten Aktivität dieser stärksten Protease des menschlichen Plasmas nicht gerecht. Plasmin gehört aufgrund des Serinrestes im aktiven Zentrum zu den Serinproteasen, zu denen man auch Trypsin, Chymotrypsin und die meisten Enzyme der Gerinnungskaskade zählt. So hydrolysiert Plasmin neben Fibrin und Fibrinogen die Gerinnungsfaktoren II, V, VIII und möglicherweise auch XIII, sowie Komplementfaktoren und Immunglobuline.

Natives Kollagen entgeht der Hydrolyse. Aufgrund dieser extremen hydrolytischen Eigenschaften liegt Plasmin im menschlichen Plasma in seiner enzymatischen Vorstufe vor und ist mit einer hohen Konzentration von Antiplasminen ($alpha_1$-Antitrypsin, $alpha_2$-Makroglobulin) konfrontiert.

Verglichen mit der Effektivität einer Plasminogenaktivation durch Streptokinase ist die Aktivierung durch körpereigene Aktivatoren recht träge.

2.3 Streptokinase

Streptokinase ist ein extrazellulär angereichertes Stoffwechselprodukt verschiedener Streptokokkenstämme. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 47.000. Seine spezifische Aktivität beträgt 90.000 - 100.000 Einheiten pro 1 mg Protein. Anfänglich war man der Auffassung Streptokinase besitze eigene enzymatische Eigenschaften gegenüber Fibrin; jedoch erst unter Mitwirkung von Plasminogen zeigen entsprechende Ansätze lytische Aktivität. Die Koppelung von Streptokinase an Plasminogen wird modellhaft als Induktion einer Konformationsänderung des Plasminogens verstanden. Durch einen hierbei freigelegten katalytischen Zweig des so gebildeten Plasminogen-Streptokinase-Komplexes wird ein weiteres nicht an Streptokinase gekoppeltes Plasminogenmolekül zum fibrinolytisch aktiven Plasmin konvertiert:

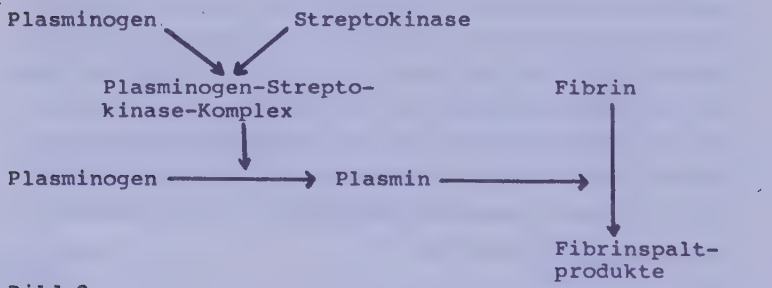


Bild 2

Wird Streptokinase im Überschuß in den Ansatz gebracht entsteht lediglich der zu Beginn dieser zweiphasischen Reaktion gebildete Plasminogen-Streptokinase-Komplex. Dieser besitzt ausschließlich hydrolytische Eigenschaften gegenüber kleinen Proteinen und vermag Fibrin oder die anderen in Frage kommenden Makromoleküle nicht zu lysieren. Heimburger et al. führen dies auf eine Kaschierung des aktiven Zentrums im Plasminogen-Streptokinase-Komplex zurück, da mit zunehmender Konzentration von Streptokinase die proteolytische Aktivität abnimmt und der Komplex seine esterolytischen Eigenschaften beibehält. Aufgrund der geringen Größe chromogener Substrate werden diese durch den Komplex an entsprechender Stelle amidolytisch gespalten.

2.4 Nachweismethoden für Plasminogen im menschlichen Plasma

Seit der Erstbeschreibung der Fibrinolyse durch Dastre (1893) und der Vorstellung eines Plasminogen-Plasmin-Modells durch Christensen (1945) wurde eine Reihe von Publikationen zum Thema der qualitativen und quantitativen Plasminogenbestimmung im menschlichen Plasma verfaßt. Prinzipiell arbeiten alle Methoden entweder mit Hilfe eines indirekten oder direkten Nachweises, d.h. Plasminogen wird entweder funktionell nach Aktivation zum proteolytisch aktiven Plasmin oder immunologisch bestimmt. Bei den indirekten Methoden bieten sich zwei Möglichkeiten: Einerseits kann das in den Proben vorhandene Plasminogen durch z.B. Streptokinase zu Plasmin umgewandelt werden, und dann anhand seiner proteolytischen Aktivität gegenüber z.B. Kasein getestet werden (=Kaseinolytische Methode nach Remmert und Cohen - unter Verwendung von Euglobulinfraktionen). Zum anderen kann ein vollständiges Umsetzen des Probenplasminogen in den Plasminogen-Streptokinase-Komplex dazu genutzt werden, daß dieser Komplex vorgelegtes Rinderplasminogen zum Plasmin konvertiert und je nach Plasminogengehalt der Proben ein Standardgerinnsel mehr oder weniger schnell lysiert (=Fibrinolytische Methode nach Berg, Korsan-Bengtsen und Ygge - unter Vorlage von Fibrinogen, Streptokinase, Thrombin und Plasminogen). Auch die koagulometrische Methode nach Jacobi gehört zu den indirekten Methoden des ersten Typs. Hierbei wird eine vorgegebene Gerinnungszeit eines Normalplasmas durch das Plasmin der Proben verlängert und dies als Maß für deren Plasminogengehalt gewertet. Eine Vereinfachung der Auswertung indirekter Meßmethoden bietet die Fibrinplattenmethode

nach Astrup, Müllertz und Lassen. Hierbei werden plasminogenfreie Rinderfibrinplatten mit streptokinaseaktivierten Proben benetzt und die Größe der entstehenden Lysezonen in entsprechende Konzentrationsverhältnisse gesetzt.

Eine weitere indirekte und elegante Methode der Plasminogenbestimmung ist die Fluoreszenzmethode nach Lüscher und Käser-Glanzmann, die neben der quantitativen Aussage zum Plasminogengehalt eingesetzter Proben auch zeitliche Verlaufsbeobachtungen wie die der Inhibitionen der Fibrinolyse zuläßt. Hierbei wird mit einem Fluoreszensstoff markiertes Fibrinogen unter Zugabe von Thrombin und Probenplasma zuerst in Fibrin überführt und durch Einwirkung des Plasmin wieder lysiert. Dabei freigesetzter Fluoreszenzfarbstoff dient dann zur Beurteilung des Plasminogengehalts in den Proben. Eine andere Variante der Substratmarkierung ist die Isotopenmethode nach Alkjaersig et al., bei der die durch Probenplasmin freigesetzte Radioaktivität eines J^{131} enthaltenden Standardgerinnsels die Plasminogenkonzentration anzeigt. Eine direkte und sehr exakte Methode ist die Radiale Immundiffusion nach Mancini. Ein in einem Gel enthaltener Antikörper bildet mit eindiffundierendem Plasminogen einen sichtbaren Niederschlag. Das Quadrat der so erhaltenen Reaktionszone steht in direktproportionalem Verhältnis zum Probenplasminogengehalt. Über mitgeführte Standards erhält man eine Bestimmung in mg/100 ml. Alle diese Methoden sind arbeits- und zeitintensiv. Die Frage der Spezifität - z.B. infolge der Anwesenheit von Plasmininhibitoren - begrenzt ihre Anwendbarkeit in der klinischen Routinediagnostik.

2.5 Probleme der Proteasenaktivitätsbestimmung mit Hilfe Chromogener Peptidsubstrate am Beispiel des S225I

Die Bestimmung von Proteasenaktivitäten im menschlichen Plasma unter Vorlage physiologischer Substrate fordert bei mäßiger Genauigkeit zumeist einen großen zeitlichen und technischen Aufwand. Auch die Bereitstellung homogener und damit spezifischer natürlicher Substrate hat seine technischen Grenzen, sodaß Verunreinigungen in den eingesetzten Präparationen schwer kontrollierbare Resultatschwankungen zeigen können. Außerdem werden physiologische Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit an verschiedenen Peptidsequenzen zugleich gespalten. Auf der Suche nach künstlichen Substraten stieß man auf Aminosäureamide wie das BAPNA (Bz-Arg-pNA HCl). Im Gegensatz zu den meisten natürlichen Substraten sind diese als chromogene Peptidstubstrate bezeichneten Aminosäureamide chemisch rein darstellbare Substanzen. Bei der amidolytischen Spaltung der chromogenen Gruppe (p-Nitroanilin) vom Hauptmolekül färbt sich der entsprechende Ansatz direkt proportional zur vorliegenden Enzymaktivität.

Synthetische, chromogene Substrate müssen prinzipiell folgenden theoretisch zu fordernden Bedingungen genügen, um bei ausreichender Spezifität für die Bestimmung der entsprechenden Protease anwendbar zu sein:

1. Das Substrat darf nur an einer Stelle im Molekül gespalten werden: Beim S225I an der Aminbindung

zwischen Lysin und dem p-Nitroanilin:

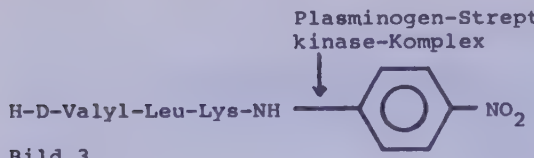


Bild 3

2. Das farbige Reaktionsprodukt muß einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten haben: Beim p-Nitroanilin beträgt er bei 405 nm 10,5 $cm^2/\mu mol$.

3. Zur Vermeidung störender Absorptionen im Probenmaterial soll das Substrat einerseits keine Eigenabsorption aufweisen, zum anderen soll der optimale Absorptionsbereich des freigesetzten Farbproduktes Einflüsse durch andere Proteine (bei ca. 280 nm) in den Proben ausschließen: Beim S225I bzw. p-Nitroanilin werden Enzymaktivität und gemessene Absorptionen optimal proportionalisiert bei 405 nm.

4. Die enzymatische Hydrolyse des chromogenen Substrates muß den Gesetzen von Michaelis und Menten folgen. D.h. entstehende Reaktionsprodukte wie das hier anfallende Peptidacylderivat und das färbende Aminderivat dürfen die Reaktion weder beschleunigen noch inhibieren.

5. Die Wasserlöslichkeit des Substrates sollte den mindestens fünffachen K_m-Wert erreichen: Beim S225I liegt die Löslichkeit bei 4,0 10^{-3} mol/l.

Da die aufgezeigten Bedingungen - wie u.a. nachfolgend gezeigt wird - durch das Substrat S225I bzw. durch das Enzym-Substrat-System (aus aktiviertem Plasminogen und S225I) erfüllt werden, sind die Plasminogenkonzentrationen verwendeter Proben nach Optimierung der entsprechendenden Milieuparameter direkt proportional den gemessenen Extinktionsänderungen pro min.

3.0 Materialien

1. Cobas-Bio Zentrifugalanalysator
   Hoffmann La Roche

2. Chromogenes Peptidsubstrat S225I
   H-D-Valyl-L-leucyl-L-lysin-p-nitroanilin
   Dihydrochlorid MG. 551.5 in 1/3 Triäthanolaminpuffer-
   lösung 2/3 Aqua dest.

3. Triäthanolaminhydrochlorid/ph-Einstellung mit NaOH
   (vergleiche: Lit. 5)

4. Teststreptokinase 5000IE
   Behring Werke Marburg Lahn

5. 0,1 mol/l Na-Citratlösung ph = 7,5

6. Normalplasmapool entsprechend Lit. 12

7. Patientenplasmen
   9 ml Venenblut + 1 ml Na-Citrat, 2500 g,
   gelagert bei -30°C

8. Immundiffusionsplatten (M-Partigen Behring Werke
   Marburg Lahn)

9. Proteinstandards
   (Behring)

10. Standardhumanplasma
    (Behring)

4.0 Methoden

A) Chromogene Methode

Programmierung des Cobas-Bio:

Programm:	A	B	C
1 Units	dE/min	%	dE/min
2 Calc. factor	0	0	0
3 Standard 1	0	100	0
4 Standard 2	0	150	0
5 Standard 3	0	25	0
6 Limit	0	0	0
7 Temperatur	37°C	37°C	37°C
8 Type of analysis:	initial rate	initial rate	encyme kinetic mode
9 Wave length:	405 nm	405 nm	405 nm

10 Sample vo.	50 µl	50 µl	50 µl
11 Diluent vol.	25 µl	25 µl	25 µl
12 Reagent vol.	100 µl	100 µl	100 µl
13 Incub. time	0 sec	0 sec	0 sec
14 Startrea . vol.	0 µl	0 µl	0 µl
15 Time of 1.read.	10 sec	10 sec	10 sec
16 Time intervall	10 sec	10 sec	10 sec
17 Number of read.	15	15	15
18 Blanking mode	0	0	0
19 Printout mode	2	1	3

Normal- und Spenderplasmen werden wie folgt aktiviert: 50 µl des jeweiligen Plasmas werden mit 200 µl gepufferter Streptokinaselösung versetzt und im Wasserbad inkubiert. Die Konzentrationen der Streptokinase werden pro ml inkubiertem Ansatz angegeben. Die Reaktion wird unter Vorlage des Chromogenen Substrates im Zentrifugalanalysator mit Hilfe der aktivierten Probe gestartet.

Programmwahl, Plasmakonzentration, Substratkonzentration, Streptokinasekonzentration und Inkubationsbedingungen werden entsprechend der gegebenen Fragestellung variiert.

Sämtliche vorgestellten Messungen werden unter Verwendung derselben Ansätze parallel doppelt bestimmt und die Meßwerte gemittelt.

B) Radiale Immundiffusion

Bei jeder durchgeführten Messung wird ein Kontrollplasma mitgeführt. Die eingesetzten Normal- und Spenderplasmen werden in Form einer 1:4 - bzw. 1:8 - Pufferverdünnung gemessen und die Resultate gemittelt. Mit Hilfe der als Bezugssystem in diesem Test verwendeten Standards werden nach Quadrierung der optisch vermessenen Niederschläge (mm^2) rechnerisch entsprechende Anpassungsgeraden (lineare Regression) gebildet.

5.0 Ergebnisse

5.1 ph-Optimum der Reaktion

Methodik

a) Programm A

b) Normalplasmaverdünnung 1:4, ph = variabel

c) Substratkonzentration = 10 mmol/l

d) Streptokinasekonzentration = 10.000 IE/ml

e) Inkubation = 10 min bei 37°C

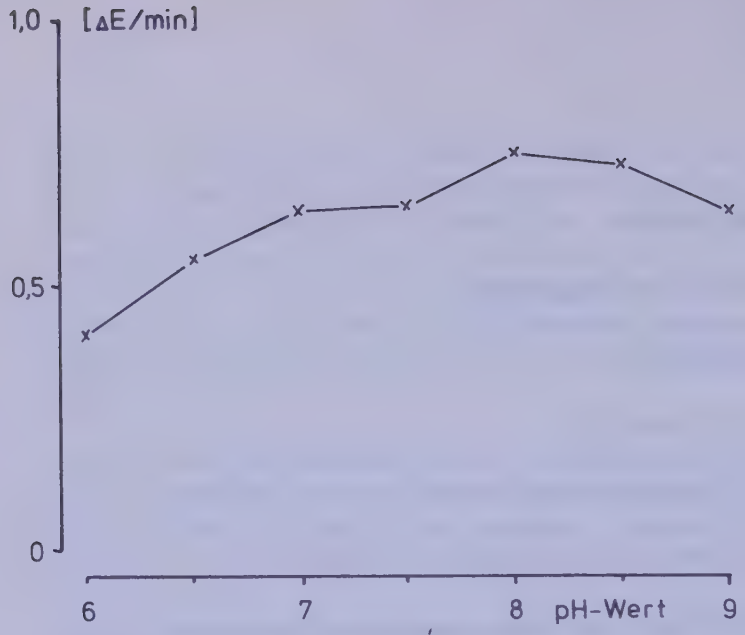


Bild 4
Verhalten der Umsatzgeschwindigkeit der Normalplasma-verdünnung 1:4 unter Variation des ph.

Tabelle 1

ph	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
$\bar{x}$ (dE/min)	0.41	0.547	0.636	0.653	0.753	0.730	0.641
Vk %(n=10)	7.3	7.2	4.9	4.4	6.6	5.6	5.0
(dE/min)	0.42	0.55	0.63	0.64	0.78	0.78	0.61
	0.39	0.56	0.60	0.65	0.73	0.70	0.69
	0.38	0.50	0.68	0.63	0.76	0.73	0.62
	0.45	0.52	0.67	0.68	0.69	0.68	0.59
	0.43	0.49	0.60	0.66	0.79	0.69	0.64
	0.46	0.57	0.62	0.64	0.73	0.76	0.65
	0.40	0.60	0.61	0.68	0.68	0.73	0.62
	0.39	0.58	0.63	0.65	0.81	0.74	0.64
	0.41	0.59	0.64	0.60	0.83	0.80	0.68
	0.37	0.51	0.68	0.70	0.73	0.69	0.67

5.2 Optimale Streptokinasekonzentration im Inkubationsansatz

Methodik

a) Programm A

b) Normalplasmaverdünnung 1:2, 1:4, 1:8, 1:16,
ph = 8,0

c) Substratkonzentration = 10 mmol/l

d) Streptokinasekonzentration = variabel, (IE/ml = SKE/ml)

e) Inkubation = 10 min bei 37°C

Tabelle 2

Streptokinase-einheiten/ml	Normalplasmaverdünnungen 1:2	1:4	1:8	1:16	
	0.200	0.120	0.080	0.045	dE/min
125 (SKE/ml)	0.220	0.130	0.080	0.050	
	0.200	0.110	0.080	0.050	
$\bar{x}$ (dE/min)	0.206$\bar{6}$	0.120	0.080	0.0483$\bar{3}$	
	0.290	0.180	0.120	0.080	
250 (SKE/ml)	0.280	0.180	0.130	0.080	
	0.280	0.190	0.120	0.080	
$\bar{x}$ (dE/min)	0.283$\bar{3}$	0.186$\bar{6}$	0.123$\bar{3}$	0.080	
	0.385	0.240	0.170	0.095	
500 (SKE/ml)	0.320	0.245	0.170	0.100	
	0.380	0.240	0.170	0.100	
$\bar{x}$ (dE/min)	0.3616$\bar{6}$	0.2516$\bar{6}$	0.170	0.0983$\bar{3}$	
	0.515	0.330	0.210	0.110	
1000 (SKE/ml)	0.530	0.350	0.220	0.100	
	0.520	0.330	0.200	0.110	
$\bar{x}$ (dE/min)	0.5216$\bar{6}$	0.336$\bar{6}$	0.210	0.110	
	0.785	0.460	0.260	0.120	
2000 (SKE/ml)	0.815	0.480	0.280	0.140	
	0.750	0.440	0.260	0.140	
$\bar{x}$ (dE/min)	0.783$\bar{3}$	0.460	0.26$\bar{6}$	0.13$\bar{3}$	
	1.015	0.590	0.290	0.150	
4000 (SKE/ml)	1.095	0.630	0.335	0.170	
	1.085	0.615	0.330	0.170	
$\bar{x}$ (dE/min)	1.065	0.6116$\bar{6}$	0.3183$\bar{3}$	0.176$\bar{6}$	
	1.245	0.635	0.360	0.170	
6000 (SKE/ml)	1.285	0.690	0.360	0.175	
	1.230	0.675	0.360	0.170	
$\bar{x}$ (dE/min)	1.253$\bar{3}$	0.6$\bar{6}$	0.360	0.1716$\bar{6}$	
	1.345	0.740	0.370	0.190	
8000 (SKE/ml)	1.350	0.780	0.400	0.200	
	1.360	0.750	0.410	0.200	
$\bar{x}$ (dE/min)	1.3516$\bar{6}$	0.756$\bar{6}$	0.393$\bar{3}$	0.196$\bar{6}$	
	1.370	0.800	0.425	0.210	
10000 (SKE/ml)	1.385	0.840	0.460	0.190	
	1.375	0.800	0.445	0.200	
$\bar{x}$ (dE/min)	1.376$\bar{6}$	0.813$\bar{3}$	0.443$\bar{3}$	0.200	
	1.370	0.840	0.435	0.200	
12000 (SKE/ml)	1.330	0.820	0.415	0.200	
	1.380	0.845	0.440	0.190	
$\bar{x}$ (dE/min)	1.360	0.835	0.430	0.193$\bar{3}$	
	1.360	0.880	0.460	0.220	
14000 (SKE/ml)	1.370	0.840	0.450	0.220	
	1.360	0.810	0.400	0.200	
$\bar{x}$ (dE/min)	1.363$\bar{3}$	0.843$\bar{3}$	0.436$\bar{6}$	0.213$\bar{3}$	

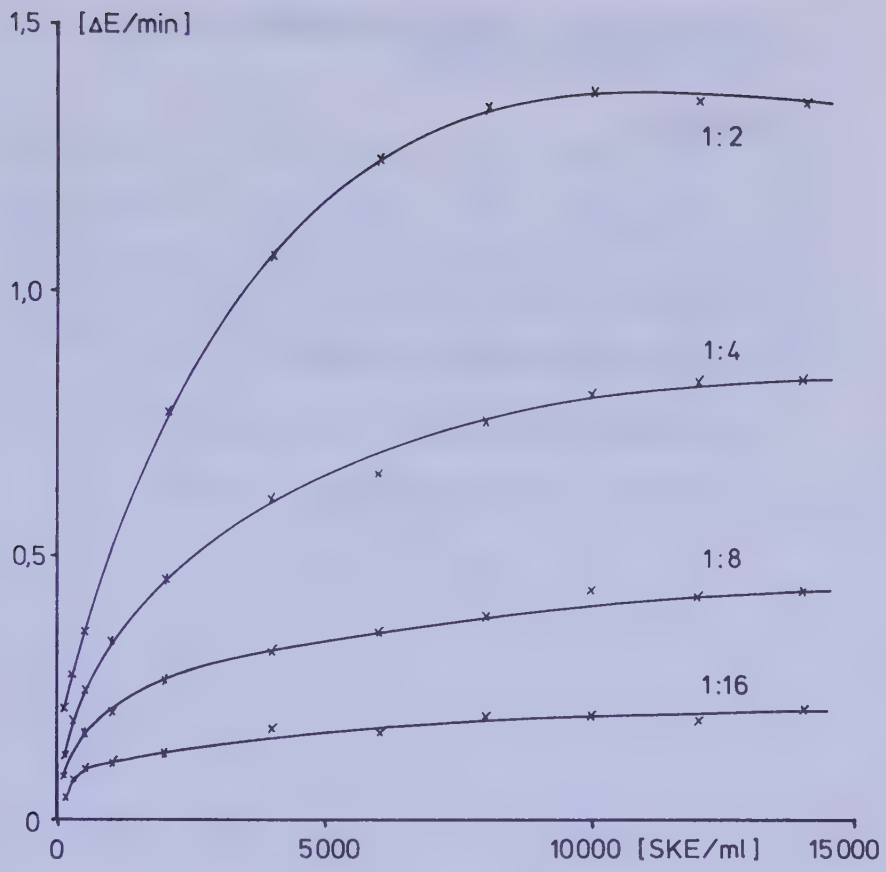


Bild 5

Verhalten der Umsatzgeschwindigkeit unter Variation der Streptokinasekonzentration im Inkubationsansatz für die Normalplasmaverdünnungen 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16

5.3 Inkubationszeit, Temperaturabhängigkeit und Stabilität der Ansätze

Methodik

a) Programm A

b) Normalplasmaverdünnung 1:4, ph = 8,0

c) Substratkonzentration = 10 mmol/l

d) Streptokinasekonztration = 10.000 IE/ml

e) Inkubation, Zeit und Temperatur = variabel

5.3.1 Variation der Inkubationszeit

Tabelle 3

	dE/min					$\bar{x}$(dE/min)	Vk (%)
37°C/2 min	0.34	0.20	0.42	0.38	0.48	0.364	28,9
37°C/5 min	0.72	0.83	0.69	0.70	0.58	0.704	12,7
37°C/10min	0.84	0.85	0.82	0.88	0.84	0.846	2,6
37°C/15min	0.85	0.85	0.80	0.88	0.84	0.844	3,4
37°C/30min	0.89	0.86	0.82	0.84	0.85	0.852	3,0

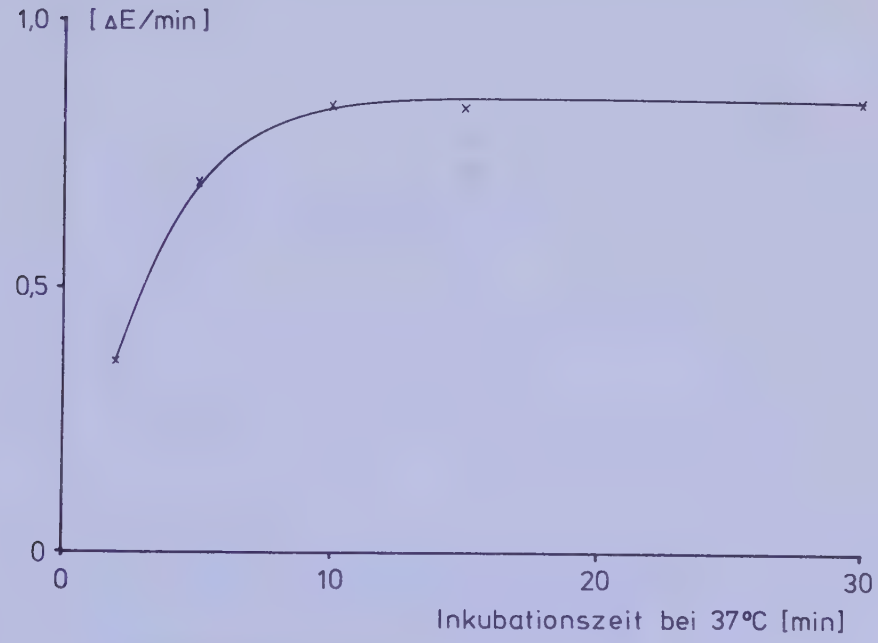


Bild 6

Verhalten der Umsatzgeschwindigkeit der Normalplasma-verdünnung 1:4 unter Variation der Inkubationszeit bei 37°C

5.3.2 Variation der Inkubationstemperatur

Tabelle 4

	dE/min					$\bar{x}$(dE/min)	Vk(%)
25°C/10min	0.74	0.80	0.69	0.78	0.81	0.764	6,5
30°C/10min	0.76	0.84	0.81	0.68	0.82	0.782	8,2
37°C/10min	0.85	0.83	0.82	0.89	0.86	0.850	3,2
42°C/10min	0.85	0.83	0.80	0.80	0.74	0.804	5,2
50°C/10min	0.85	0.80	0.78	0.80	0.76	0.798	4,2

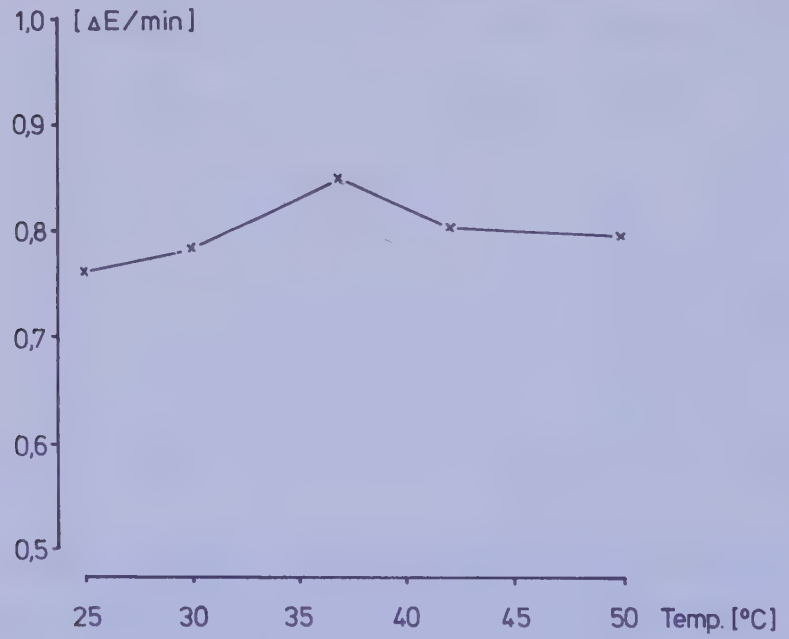


Bild 7

Verhalten der Umsatzgeschwindigkeit der Normalplasma-verdünnung 1:4 unter Variation der Inkubationstemperatur bei 10 minütiger Inkubation

5.3.3 Stabilität der Ansätze nach Lagerung bei Raumtemperatur

Tabelle 5

	dE/min					$\bar{x}$(dE/min)	Vk(%)
37°C/10 min Lagerung 0 min	0.85	0.80	0.83	0.79	0.85	0.824	3,4
gleicher Ansatz Lagerung 60 min	0.87	0.79	0.80	0.82	0.81	0.818	3,8

5.4 Michaelis-Menten-Konstante für den Plasminogen-Streptokinase-Komplex

Methodik

a) Programm A

b) Normalplasmaverdünnungen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, ph = 8,0

c) Substratkonzentration = variabel

d) Streptokinasekonzentration = 10.000 IE/ml

e) Inkubation = 10 min bei 37°C

Tabelle 6

Normalplasmaverdünnungen

Substratkonz. in der Vorlage (mmol/l)	1:2	1:4	1:8	1:16	
	1.21	0.87	0.46	0.25	dE/min
	1.29	0.85	0.44	0.23	
10	1.31	0.86	0.43	0.22	
	1.33	0.87	0.45	0.24	
	1.28	0.85	0.43	0.22	
$\bar{x}$	1.284	0.860	0.442	0.232	
Vk (%)	3,6	1,2	3,0	5,6	
Volumenaktivität V (U/l)	611.4	409.5	210.5	110.5	
	1.21	0.83	0.45	0.23	
	1.22	0.83	0.43	0.21	
7.5	1.21	0.82	0.44	0.22	
	1.28	0.86	0.45	0.23	
	1.23	0.86	0.43	0.22	
$\bar{x}$	1.23	0.84	0.44	0.222	
Vk (%)	2,4	2,2	2,3	3,8	
Volumenaktivität V (U/l)	585.7	399.9	209.5	105.7	
	1.24	0.81	0.40	0.22	
	1.22	0.78	0.39	0.21	
5.0	1.20	0.73	0.38	0.20	
	1.23	0.78	0.41	0.21	
	1.25	0.85	0.43	0.21	
$\bar{x}$	1.228	0.790	0.402	0.210	
Vk (%)	1,6	5,6	4,8	3,4	
Volumenaktivität V (U/l)	584.8	376.2	191.4	100.2	

Forts. Tabelle 6

Normalplasmaverdünnungen

Substratkonz. in der Vorlage (mmol/l)	1:2	1:4	1:8	1:16	
	1.17	0.64	0.36	0.20	dE/min
	1.15	0.65	0.34	0.18	
2.5	1.18	0.67	0.36	0.18	
	1.14	0.65	0.33	-	
	1.16	0.67	0.35	0.19	
$\bar{x}$	1.16	0.656	0.348	0.1875	
Vk (%)	1,4	2,1	3,8	5,1	
Volumenaktivität V (U/l)	552.4	312.4	165.7	89.3	
	1.02	0.61	0.29	0.15	
	1.07	0.60	0.32	0.16	
1.25	1.06	0.59	0.30	0.15	
	1.07	0.59	0.31	0.15	
	1.02	0.58	0.30	0.16	
$\bar{x}$	1.048	0.594	0.304	0.154	
Vk (%)	2,5	1,9	3,8	3,6	
Volumenaktivität V (U/l)	499.0	282.9	144.8	73.3	
	0.77	0.44	0.22	0.13	
	0.74	0.43	0.21	0.10	
0.625	0.76	0.44	0.22	0.11	
	0.80	0.46	0.25	0.13	
	0.74	0.43	0.22	0.11	
$\bar{x}$	0.762	0.44	0.224	0.116	
Vk (%)	3,3	2,8	6,8	11,6	
Volumenaktivität V (U/l)	362.9	209.5	106.6	55.2	

Forts. Tabelle 6

Substratkonz. in der Vorlage (mmol/l)	Normalplasmaverdünnungen 1:2	1:4	1:8	1:16	
	0.45	0.24	0.15	0.07	dE/min
	0.43	0.24	0.16	0.08	
0.3125	0.45	0.28	0.16	0.08	
	0.43	0.27	0.15	0.08	
	0.45	0.27	0.15	0.08	
$\bar{x}$	0.442	0.260	0.154	0.078	
Vk (%)	2,5	7,2	3,6	5,7	
Volumenaktivität V (U/l)	210.5	123.8	73.3	37.1	

Bei Photometern mit longitudinal zum Lichtstrahl liegenden Küvetten berechnet sich die Volumenaktivität V (U/l) wie folgt:

$$V\ (U/l) = \frac{r^2}{a \cdot PV} \cdot \frac{dE}{min}$$

r = Kantenlänge der Küvetten
a = (mikro)molarer Extinktionskoeffizient
PV = Probenvolumen

V (U/l) und K_m (mol/l) wurden mit Hilfe linearer Regression ermittelt.
Berücksichtigt man die durch den Pipettiervorgang des Cobas-Bio eintretende Verdünnung, so erhält man folgende Werte für die enzymatischen Kenngrößen der Reaktion:

Tabelle 7

Normalplasma-verdünnung	K_m (mol/l)	Vmax µmol/l min)
1:2	$3.9\ 10^{-4}$	696.7
1:4	$4.5\ 10^{-4}$	443.6
1:8	$3.5\ 10^{-4}$	216.4
1:16	$3.8\ 10^{-4}$	113.1
$\bar{x}$	$3.9\ 10^{-4}$	

	Schnittpunkte		Steigung
	x-Achse	y-Achse	m
1:16	-1,539	$8{,}80 \cdot 10^{-3}$	$5{,}72 \cdot 10^{-3}$
1:8	-1,617	$4{,}62 \cdot 10^{-3}$	$2{,}86 \cdot 10^{-3}$
1:4	-1,276	$2{,}26 \cdot 10^{-3}$	$1{,}77 \cdot 10^{-3}$
1:2	-1,472	$1{,}48 \cdot 10^{-3}$	$1{,}00 \cdot 10^{-3}$

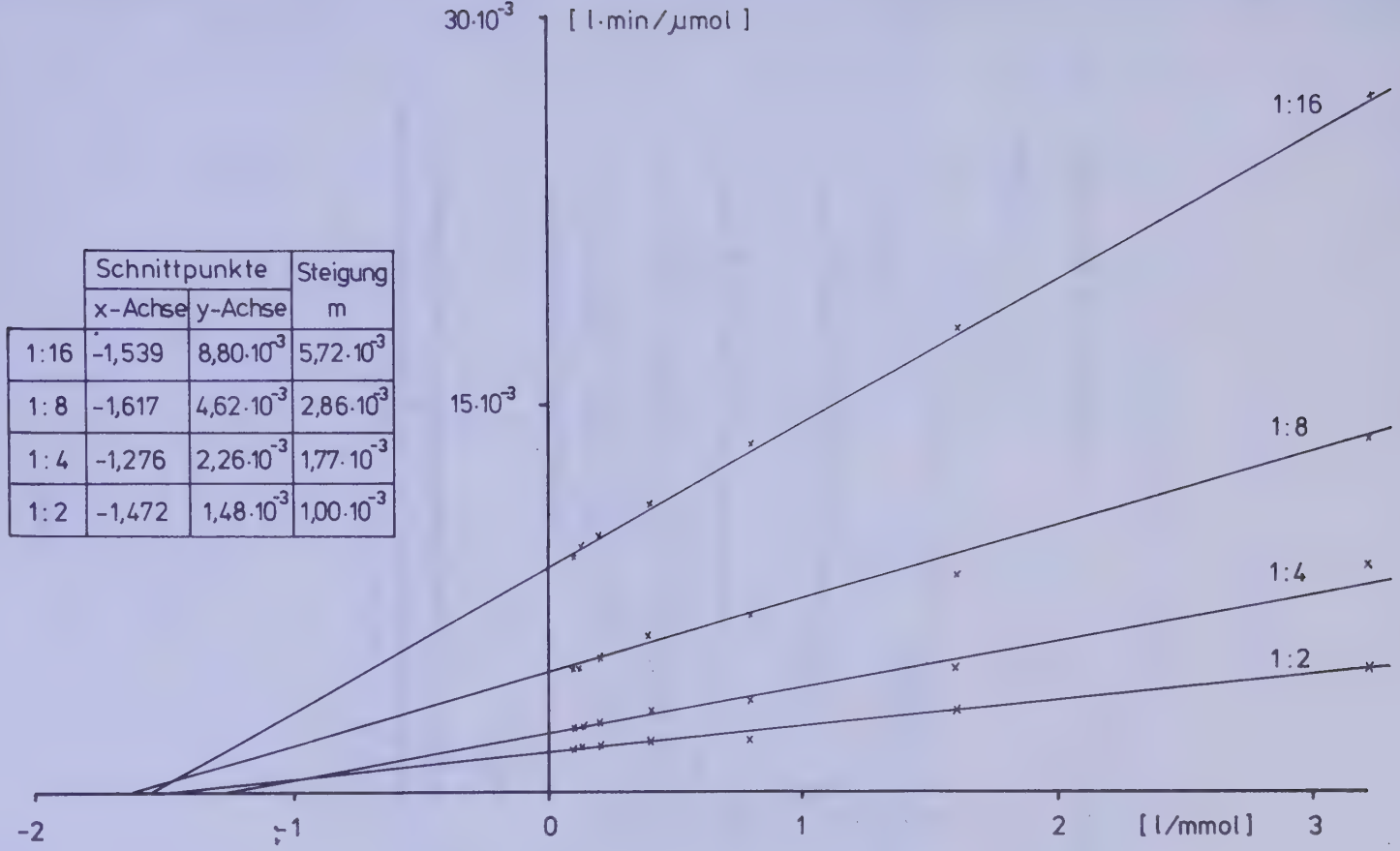


Bild 8

Darstellung der Michaelis-Menten-Konstante im Lineweaver-Burk-Diagramm durch Auftragen der reziproken Volumenaktivitäten und der zugehörigen Substratkonzentration für die Normalplasmaverdünnungen 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16.

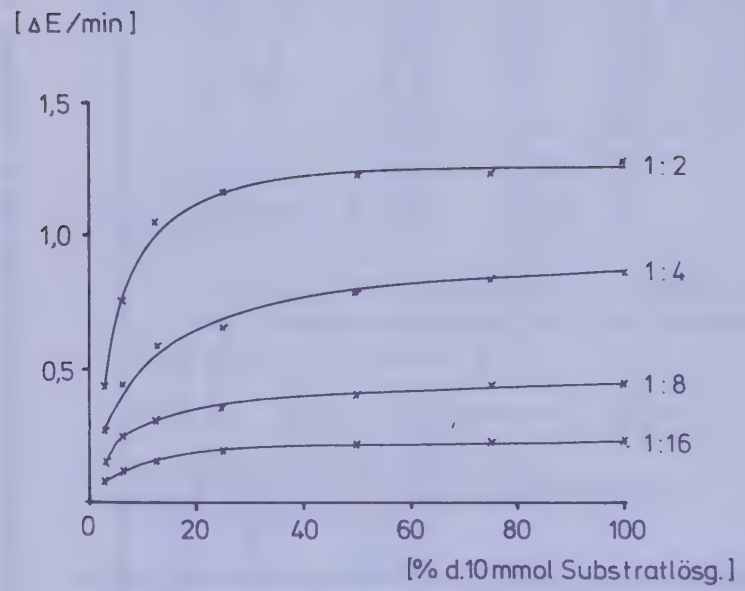


Bild 9

Verhalten der Umsatzgeschwindigkeit bei zunehmender Substratkonzentration für die Normalplasmaverdünnungen 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16.

5.5 Linearität in der Meßzeit

Methodik

a) Programm C

b) Normalplasmaverdünnung 1:2, 1:3, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, ph = 8,0

c) Substratkonzentration = 8 mmol/l

d) Streptokinasekonzentration = 10.000 IE/ml

e) Inkubations = 10 min bei 37°C

Linearität in der Meßzeit

Tabelle 8

	Sample	Time	Values			
Normalplasma-	01-01	0	1.0356	1.2920	1.5450	1.7981
verdünnung		4	2.0489	2.3015	2.5389	2.7765
		8	3.0165	3.2150	3.3949	3.6113
1:2		12	3.6529	3.7439	3.9047	
			dE/min = 1.26			
	01-02	0	1.0437	1.3028	1.5608	1.8173
		4	2.0719	2.3234	2.5821	2.8091
		8	3.0279	3.2620	3.4449	3.6352
		12	3.7734	3.8487	3.8770	
			dE/min = 1.28			
Normalplasma-	01-03	0	.8580	1.0540	1.2480	1.4429
verdünnung		4	1.6374	1.8282	2.0198	2.2048
		8	2.3921	2.5799	2.7485	2.9264
1:3		12	3.0789	3.2245	3.4021	
			dE/min = 1.09			
	01-04	0	.8635	1.0627	1.2589	1.4554
		4	1.6505	1.8470	2.0389	2.2315
		8	2.4199	2.5951	2.7830	2.9762
		12	3.1252	3.3090	3.4385	
			dE/min = 1.12			
Normalplasma-	01-05	0	.7002	.8416	.9817	1.1208
verdünnung		4	1.2599	1.3995	1.5373	1.6751
		8	1.8118	1.9494	2.0834	2.2148
1:4		12	2.3429	2.4665	2.6073	
			dE/min = 0.82			
	01-06	0	.6815	.8193	.9575	1.0954
		4	1.2297	1.3664	1.5014	1.6374
		8	1.7710	1.9067	2.0389	2.1697
		12	2.2954	2.4278	2.5545	
			dE/min = 0.80			
Normalplasma-	01-07	0	.4755	.5462	.6163	.6851
verdünnung		4	.7546	.8239	.8932	.9625
		8	1.0306	1.0992	1.1688	1.2366
1:8		12	1.3030	1.3701	1.4368	
			dE/min = 0.41			
	01-08	0	.4729	.5426	.6129	.6810
		4	.7501	.8184	.8878	.9568
		8	1.0251	1.0928	1.1616	1.2288
		12	1.2961	1.3629	1.4300	
			dE/min = 0.41			

Linearität in der Meßzeit

Forts. Tabelle 8

Normalplasma-verdünnung	01-09	0	.3670	.4033	.4382	.4734
		4	.5089	.5436	.5779	.6129
		8	.6474	.6821	.7163	.7519
1:16		12	.7860	.8205	.8542	
			dE/min = 0.21			
	01-10	0	.3683	.4044	.4410	.4770
		4	.5132	.5490	.5844	.6209
		8	.6552	.6910	.7269	.7621
		12	.7973	.8321	.8678	
			dE/min = 0.21			
Normalplasma-verdünnung	01-11	0	.3132	.3308	.3486	.3669
		4	.3839	.4007	.4187	.4358
		8	.4531	.4710	.4889	.5059
1:32		12	.5225	.5398	.5576	
			dE/min = 0.10			
	01-12	0	.3270	.3455	.3640	.3827
		4	.4012	.4188	.4369	.4546
		8	.4722	.4905	.5087	.5266
		12	.5435	.5609	.5793	
			dE/min = 0.11			
Normalplasma-verdünnung	01-13	0	.2933	.3027	.3116	.3205
		4	.3289	.3371	.3453	.3539
		8	.3621	.3706	.3786	.3868
1:64		12	.3953	.4026	.4114	
			dE/min = 0.05			
	01-14	0	.2866	.2960	.3052	.3135
		4	.3225	.3296	.3387	.3473
		8	.3556	.3642	.3727	.3811
		12	.3884	.3967	.4048	
			dE/min = 0.05			

Linearität in der Meßzeit

Tabelle 9

	Sample	Time	Values			
Normalplasma-verdünnung	03-01	0	1.0980	1.3669	1.6309	1.8932
		4	2.1479	2.4057	2.6518	2.8978
		8	3.1245	3.3551	3.5685	3.7171
1:2		12	3.8410	3.9843	3.9387	
			dE/min = 1.30			
	03-02	0	1.1050	1.3732	1.6362	1.8964
		4	2.1597	2.4061	2.6650	2.9034
		8	3.1981	3.3548	3.5175	3.7151
		12	3.9012	3.8159	4.1134	
			dE/min = 1.30			
Normalplasma-verdünnung	03-03	0	.9021	1.1031	1.3017	1.4989
		4	1.6921	1.8879	2.0802	2.2716
		8	2.4612	2.6506	2.8384	2.9937
1:3		12	3.1562	3.3384	3.4608	
			dE/min = 1.11			
	03-04	0	.8905	1.0924	1.2903	1.4875
		4	1.6836	1.8776	2.0739	2.2669
		8	2.4562	2.6425	2.8205	3.0087
		12	3.1901	3.3274	3.4841	
			dE/min = 1.12			
Normalplasma-verdünnung	03-05	0	.7221	.8654	1.0066	1.1471
		4	1.2864	1.4252	1.5644	1.7028
		8	1.8410	1.9807	2.1178	2.2492
1:4		12	2.3883	2.5151	2.6373	
			dE/min = 0.82			
	03-06	0	.7050	.8478	.9881	1.1278
		4	1.2669	1.4060	1.5436	1.6830
		8	1.8222	1.9597	2.0933	2.2290
		12	2.3599	2.4961	2.6205	
			dE/min = 0.82			
Normalplasma-verdünnung	03-07	0	.4966	.5711	.6430	.7156
		4	.7865	.8571	.9272	.9978
		8	1.0692	1.1388	1.2103	1.2805
1:8		12	1.3507	1.4211	1.4895	
			dE/min = 0.42			
	03-08	0	.4882	.5592	.6275	.6969
		4	.7642	.8314	.8996	.9655
		8	1.0344	1.0999	1.1676	1.2253
		12	1.3020	1.3686	1.4344	
			dE/min = 0.40			

Linearität in der Meßzeit

Forts. Tabelle 9

Normalplasma-verdünnung	03-09	0	.3801	.4197	.4580	.4964
		4	.5327	.5693	.6061	.6435
		8	.6817	.7186	.7557	.7931
1:16		12	.8307	.8679	.9039	
			dE/min = 0.22			
	03-10	0	.3798	.4195	.4566	.4951
		4	.5317	.5691	.6076	.6437
		8	.6813	.7196	.7566	.7940
		12	.8315	.8689	.9046	
			dE/min = 0.22			
Normalplasma-verdünnung	03-11	0	.3205	.3402	.3587	.3787
		4	.3955	.4138	.4323	.4500
		8	.4689	.4868	.5047	.5233
1:32		12	.5424	.5600	.5773	
			dE/min = 0.11			
	03-12	0	.3245	.3457	.3636	.3828
		4	.4009	.4193	.4380	.4568
		8	.4761	.4935	.5127	.5310
		12	.5497	.5682	.5859	
			dE/min = 0.11			
Normalplasma-verdünnung	03-13	0	.3031	.3128	.3215	.3307
		4	.3386	.3467	.3558	.3636
		8	.3728	.3815	.3898	.3993
1:64		12	.4070	.4160	.4237	
			dE/min = 0.05			
	03-14	0	.2935	.3036	.3119	.3215
		4	.3293	.3379	.3461	.3547
		8	.3635	.3721	.3807	.3891
		12	.3977	.4059	.4145	
			dE/min = 0.05			

Durch Bildung der Mittelwerte der in Tabelle 8 und 9 angegebenen Meßwerte (dE/min) erhält man die entsprechenden Koordinaten für Bild 10.

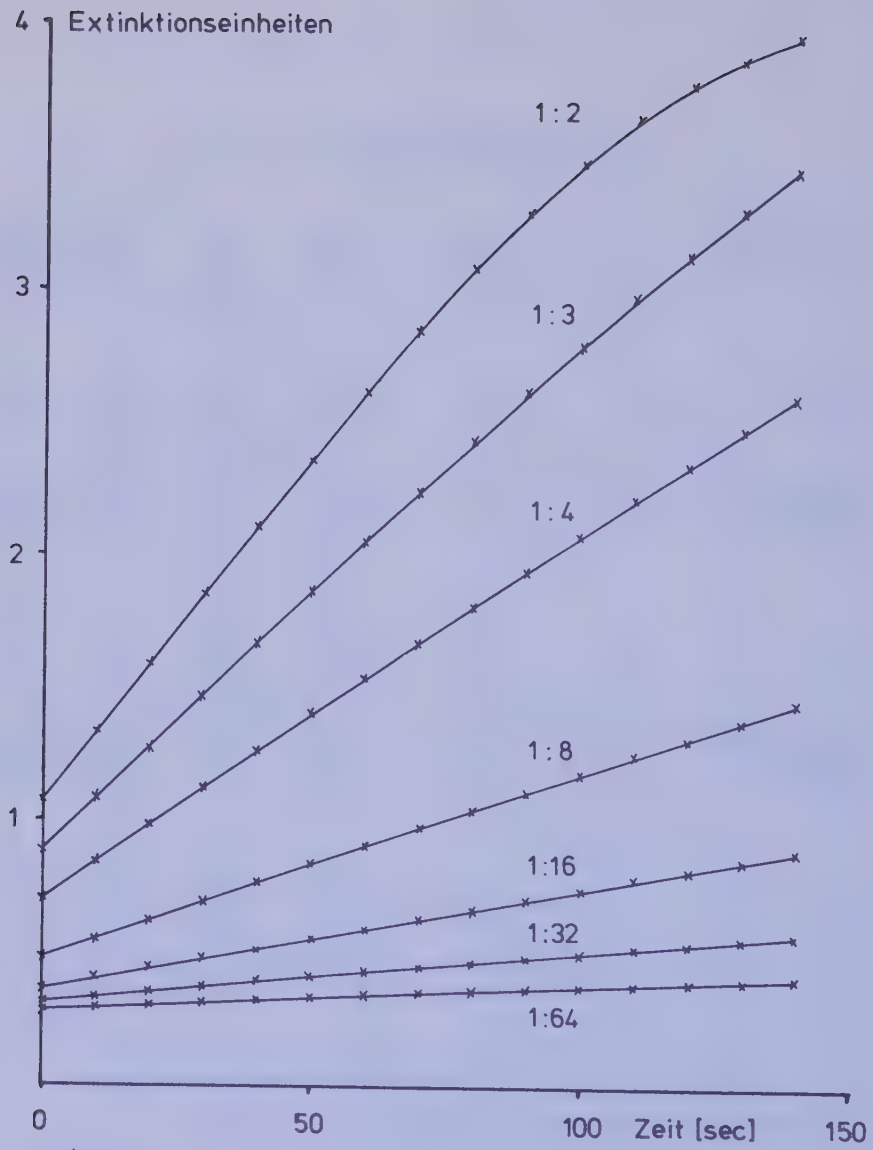


Bild 10

Darstellung des Linearitätsverlaufes der Extinktionen in der Meßzeit für die Normalplasmaverdünnungen 1:2, 1:3, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64.

5.6 Linearitätsbereich der Extinktionsänderungen für verschiedene Normalplasmakonzentrationen

Methodik

a) Programm A

b) Normalplasmaverdünnungen 1:2, 1:3, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 und 1:64, ph = 8,0

c) Substratkonzentration = 8 mmol/l

d) Streptokinasekonzentration = 10.000 IE/ml

e) Inkubation = 10 min bei 37°C

Tabelle 10

Normalplasmaverdünnung

	1:2	1:3	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
dE/min	1,27	1,10	0,82	0,40	0,21	0,11	0,05
	1,30	1,12	0,80	0,42	0,20	0,10	0,05
	1,28	1,11	0,81	0,43	0,21	0,10	0,05
	1,30	1,12	0,81	0,42	0,20	0,10	0,04
	1,29	1,10	0,80	0,40	0,22	0,11	0,05
$\bar{x}$(dE/min)	1,288	1,11	0,808	0,414	0,208	0,104	0,048
Vk (%)	1,0	0,9	1,0	3,2	4,0	5,3	9,3

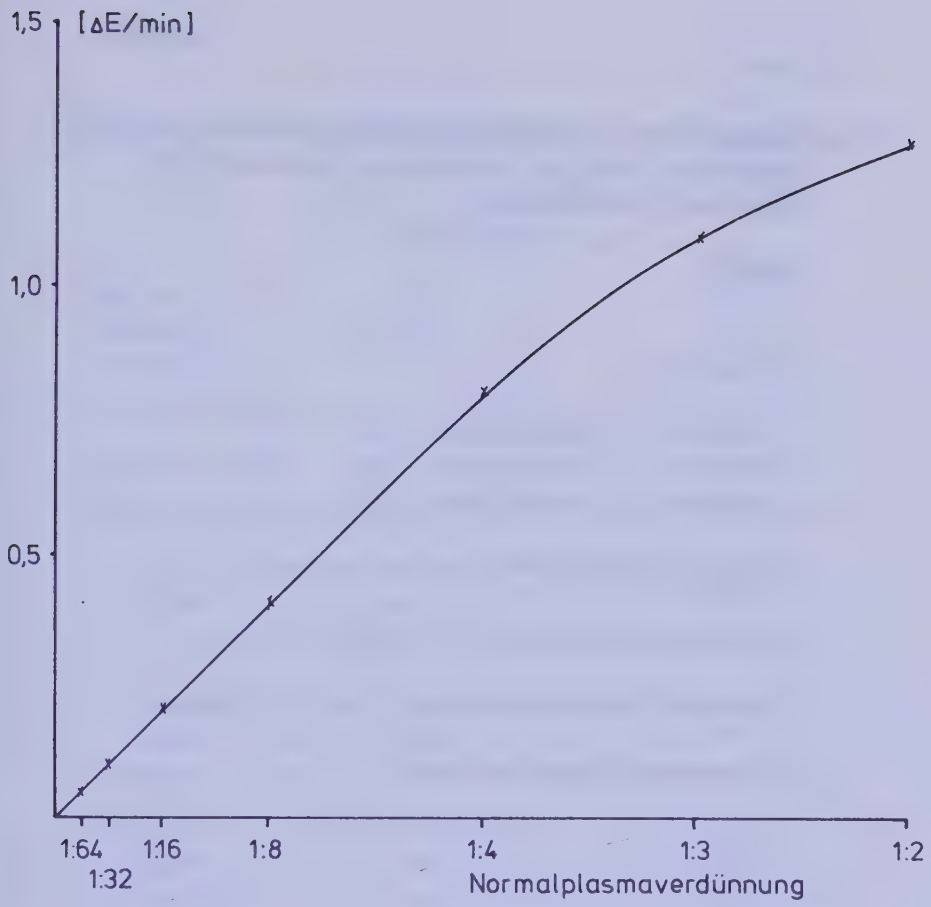


Bild 11

Linearitätsverlauf der Extinktionsänderungen (dE/min) für die Normalplasmaverdünnungen 1:2, 1:3, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 und 1:64.

5.7 Vergleichende Messung an 60 Plasmen gesunder männlicher Spender mit Hilfe der chromogenen Methode und der Radialen Immundiffusion

Methodik

A) Programm B

Standard 1 = Normalplasma 1:4
Standard 2 = Normalplasma 1:8
Standard 3 = Normalplasma 1:16

B) Spenderplasmenverdünnung 1:4 und 1:16

C) Substratkonzentration = 8 mmol/l

D) Streptokinasekonzentration = 10.000 IE/ml

E) Inkubation 10 min bei 37°C

Messung 1

Tabelle 11

	Chromogene Methode (% der Normalplasma-aktivität)	Radiale Immundiffusion mg/100 ml
Standard 1 :	96.85	
Standard 2 :	51.36	13.5
Standard 3 :	25.15	
Kontrollplasma :	-	5.95
1. Spenderplasma 1:4 :	76.700	10.60
1. Spenderplasma 1:8 :	38.015	
2. Spenderplasma 1:4 :	97.345	13.13
2. Spenderplasma 1:8 :	51.585	
3. Spenderplasma 1:4 :	85.83	13.90
3. Spenderplasma 1:8 :	38.68	

Messung 2

Forts. Tabelle 11

	Chromogene Methode (% der Normalplasma-aktivität)	Radiale Immundiffusion mg/100 ml
Standard 1 :	96.38	
Standard 2 :	51.25	13.31
Standard 3 :	25.34	
Kontrollplasma :	-	5.46
4. Spenderplasma 1:4 :	96.410	11.90
1:8 :	51.485	
5. Spenderplasma 1:4 :	130.060	17.14
1:8 :	67.350	
6. Spenderplasma 1:4 :	85.265	13.50
1:8 :	46.720	
7. Spenderplasma 1:4 :	104.890	14.32
1:8 :	57.030	
8. Spenderplasma 1:4 :	83.425	11.90
1:8 :	44.275	

Messung 3

Forts. Tabelle 11

		Chromogene Methode (% der Normalplasma-aktivität)	Radiale Immundiffusion mg/100 ml
Standard 1 :		98.000	
Standard 2 :		51.750	12.4
Standard 3 :		24.670	
Kontrollplasma :		-	5.17
9. Spenderplasma	1:4	93.920	13.50
	1:8	49.040	
10. Spenderplasma	1:4	82.725	13.28
	1:8	41.135	
11. Spenderplasma	1:4	109.905	15.36
	1:8	58.615	
12. Spenderplasma	1:4	98.170	12.39
	1:8	52.815	

Messung 4

Forts. Tabelle 11

	Chromogene Methode (% der Normalplasma-aktivität)	Radiale Immundiffusion mg/100 ml
Standard 1 :	100.70	
Standard 2 :	51.25	13.02
Standard 3 :	24.24	
Kontrollplasma :	-	5.47
13. Spender-plasma 1:4	109.075	16.17
1:8	59.780	
14. Spender-plasma 1:4	105.090	14.66
1:8	54.870	
15. Spender-plasma 1:4	106.905	14.43
1:8	56.565	
16. Spender-plasma 1:4	104.120	14.58
1:8	59.725	
17. Spender-plasma 1:4	80.490	10.51
1:8	42.050	
18. Spender-plasma 1:4	92.025	13.07
1:8	47.690	

Messung 5

Forts. Tabelle 11

		Chromogene Methode (% der Normalplasma-aktivität)	Radiale Immundiffusion mg/100 ml
Standard 1 :		97.840	
Standard 2 :		51.240	12.95
Standard 3 :		24.950	
Kontrollplasma :		-	5.82
19. Spender-plasma	1:4	104.600	14.08
	1:8	56.290	
20. Spender-plasma	1:4	104.515	11.82
	1:8	56.430	

Messung 6

Forts. Tabelle 11

	Chromogene Methode (% der Normalplasma-aktivität)	Radiale Immundiffusion mg/100 ml
Standard 1 :	96.230	
Standard 2 :	51.220	13.80
Standard 3 :	25.390	
Kontrollplasma :	-	5.80
21. Spender-plasma 1:4 :	63.125	8.80
21. Spender-plasma 1:8 :	34.480	
22. Spender-plasma 1:4 :	103.390	13.46
22. Spender-plasma 1:8 :	57.580	
23. Spender-plasma 1:4 :	83.940	11.89
23. Spender-plasma 1:8 :	44.015	
24. Spender-plasma 1:4 :	81.400	12.67
24. Spender-plasma 1:8 :	44.690	
25. Spender-plasma 1:4 :	88.330	11.59
25. Spender-plasma 1:8 :	48.275	
26. Spender-plasma 1:4 :	90.665	13.09
26. Spender-plasma 1:8 :	48.600	

Messung 7

Forts. Tabelle 11

	Chromogene Methode (% der Normalplasma-aktivität)	Radiale Immundiffusion mg/100 ml
Standard 1 :	98.750	
Standard 2 :	49.500	11.97
Standard 3 :	25.580	
Kontrollplasma :	-----	5.82
27. Spender- 1:4 :	79.355	10.13
plasma 1:8 :	44.825	
28. Spender- 1:4 :	82.380	12.92
plasma 1:8 :	47.100	
29. Spender- 1:4 :	84.590	11.89
plasma 1:8 :	44.015	
30. Spender- 1:4 :	101.230	12.11
plasma 1:8 :	58.000	
31. Spender- 1:4 :	79.715	10.36
plasma 1:8 :	40.460	
32. Spender- 1:4 :	94.630	12.76
plasma 1:8 :	51.040	

Messung 8

Forts. Tabelle 11

	Chromogene Methode (% der Normalplasma-aktivität)	Radiale Immundiffusion mg/100 ml
Standard 1 :	97.400	
Standard 2 :	51.600	12.60
Standard 3 :	24.890	
Kontrollplasma :	-----	4.98
33. Spenderplasma 1:4	108.600	13.74
1:8	60.250	
34. Spenderplasma 1:4	112.045	13.66
1:8	56.140	
35. Spenderplasma 1:4	87.115	10.84
1:8	45.940	
36. Spenderplasma 1:4	83.190	10.53
1:8	42.415	
37. Spenderplasma 1:4	82.480	10.53
1:8	39.695	
38. Spenderplasma 1:4	80.520	8.98
1:8	42.045	

Messung 9

Forts. Tabelle 11

	Chromogene Methode (% der Normalplasma-aktivität)	Radiale Immundiffusion mg/100 ml
Standard 1 :	96.330	
Standard 2 :	51.670	13.27
Standard 3 :	25.150	
Kontrollplasma :	-	5.60
39. Spenderplasma 1:4 :	95.335	12.91
1:8 :	47.710	
40. Spenderplasma 1:4 :	106.475	12.91
1:8 :	52.110	
41. Spenderplasma 1:4 :	102.180	14.25
1:8 :	57.115	
42. Spenderplasma 1:4 :	88.435	11.14
1:8 :	47.255	
43. Spenderplasma 1:4 :	85.025	10.90
1:8 :	48.235	
44. Spenderplasma 1:4 :	100.320	15.43
1:8 :	51.560	

Messung 10

Forts. Tabelle 11

	Chromogene Methode (% der Normalplasma-aktivität)	Radiale Immundiffusion mg/100 ml
Standard 1 :	96.590	
Standard 2 :	52.270	13.14
Standard 3 :	24.800	
Kontrollplasma :	-	5.20
45. Spender- 1:4	105.285	13.90
plasma 1:8	53.945	
46. Spender- 1:4	96.600	11.66
plasma 1:8	47.795	
47. Spender- 1:4	88.145	9.54
plasma 1:8	41.905	
48. Spender- 1:4	91.700	11.66
plasma 1:8	43.390	
49. Spender- 1:4	102.610	13.14
plasma 1:8	57.155	

Messung 11

Forts. Tabelle 11

		Chromogene Methode (% der Normalplasma-aktivität)	Radiale Immundiffusion mg/100 ml
Standard 1 :		98.310	
Standard 2 :		50.660	13.40
Standard 3 :		25.100	
Kontrollplasma :		-	5.83
50. Spender-plasma	1:4 :	92.745	11.66
	1:8 :	48.740	
51. Spender-plasma	1:4 :	96.130	13.90
	1:8 :	50.095	
52. Spender-plasma	1:4 :	67.690	9.54
	1:8 :	34.520	
53. Spender-plasma	1:4 :	86.650	10.24
	1:8 :	48.740	
54. Spender-plasma	1:4 :	87.325	10.94
	1:8 :	42.645	
55. Spender-plasma	1:4 :	90.030	11.66
	1:8 :	48.060	

Messung 12

Forts. Tabelle 11

	Chromogene Methode (% der Normalplasma-aktivität)	Radiale Immundiffusion mg/100 ml
Standard 1 :	97.780	
Standard 2 :	50.520	11.86
Standard 3 :	25.370	
Kontrollplasma :	-	5.00
56. Spender-plasma 1:4 :	76.565	8.80
1:8 :	40.125	
57. Spender-plasma 1:4 :	83.275	9.20
1:8 :	39.895	
58. Spender-plasma 1:4 :	92.790	10.56
1:8 :	50.230	
59. Spender-plasma 1:4 :	109.410	13.50
1:8 :	61.625	
60. Spender-plasma 1:4 :	125.445	14.40
1:8 :	66.715	

5.8 Auswertung der 12 vergleichenden Messungen an 60 Spendenplasmen

		Chromogene Methode (% der Normalplasmaaktivität)	s	Vk%	Radiale Immundiffusion (mg/100 ml) $x_{n=12}$	s	Vk%
$\bar{x}_n$=12	Standard 1	97.596$\bar{6}$	1.3	1.3			
$\bar{x}_n$=12	Standard 2	51.1825	0.7	1.4	12.935	0.608	4.7
$\bar{x}_n$=12	Standard 3	25.0525	0.4	1.5			
	Kontrollplasma				5.5	0.35	6.3

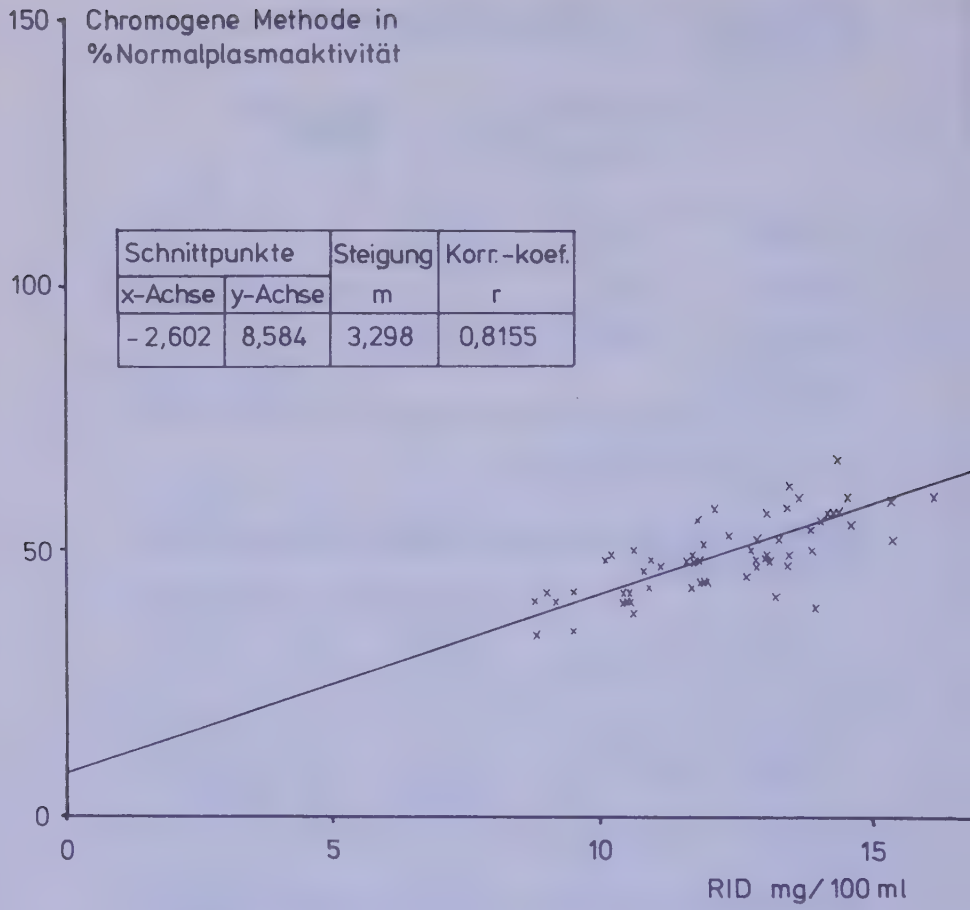
s = Standardabweichung
Vk% = Variationskoeffizient

Spannweite der Meßergebnisse beider Methoden für die 60 Spenderplasmen

		21. Spender		5. Spender
1. Radiale Immundiffusion (mg/100 ml)		8.80	---	17.14
2. Chromogene Methode (%)				
Plasmaverdünnung	1:4	63.125	---	130.060
"	1:8	34.480	---	67.350

Korrelationskoeffizient für die mit Hilfe der Radialen Immundiffusion und der Chromogenen Methode erhaltenen Meßwerte an 60 Spenderplasmen:

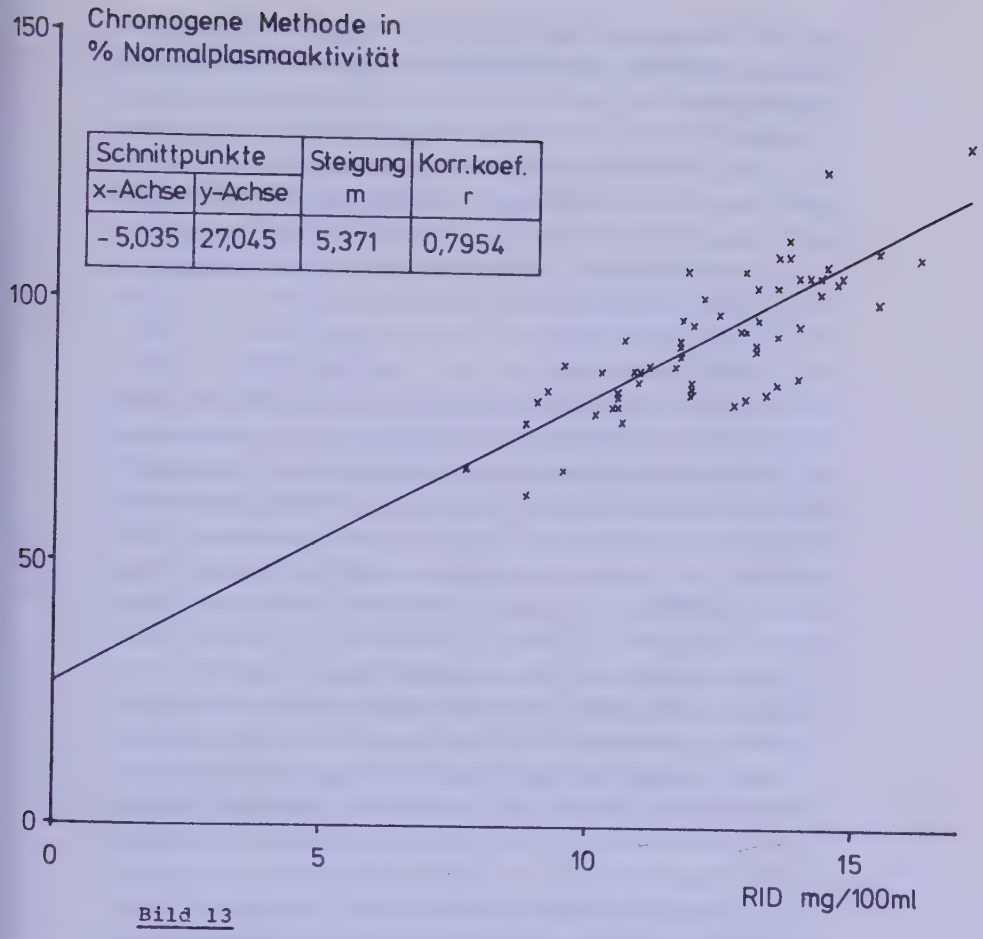
A) Plasmaverdünnung 1:4 r= 0.7954
B) Plasmaverdünnung 1:8 r= 0.8155



Schnittpunkte		Steigung	Korr.-koef.
x-Achse	y-Achse	m	r
-2,602	8,584	3,298	0,8155

Bild 12

Vergleichende Messung von 60 Spenderplasmen (Plasmaverdünnung 1:8). Gegenüberstellung der mit Hilfe der Radialen Immundiffusion (RID) und der chromogenen Methode erhaltenen Meßwerte.



Schnittpunkte		Steigung	Korr.koef.
x-Achse	y-Achse	m	r
- 5,035	27,045	5,371	0,7954

Bild 13

Vergleichende Messung von 60 Spenderplasmen (Plasmaverdünnung 1:4). Gegenüberstellung der mit Hilfe der Radialen Immundiffusion (RID) und der chromogenen Methode erhaltenen Meßwerte.

6.0 Diskussion

Für die Plasminogenbestimmung im menschlichen Plasma stehen eine Reihe erprobter Testmethoden zur Verfügung. Ihr Nachteil ist jedoch unter den Bedingungen der Notfalldiagnostik z.B. bei bestehender Hyperfibrinolyse ein großer Arbeits- und damit auch Zeitaufwand. Es war daher das Bestreben unserer Arbeitsgruppe eine Methode zu optimieren, die unter den zeitlichen Erfordernissen einer routinemäßigen Notfalldiagnostik gut reproduzierbare Ergebnisse liefert.
Für dieses Vorhaben bieten sich besonders die chromogenen Peptidsubstrate an.
Beim Aufbau der chromogenen Methode wurden die wichtigsten Milieuparameter und Volumina optimiert. Der Vergleich der hiermit erhaltenen Meßwerte mit parallel durchgeführten Messungen mit Hilfe der Radialen Immundiffusion belegt die Richtigkeit der chromogenen Methode. Die vorgestellte Optimierung des Testsystemes unter Verwendung des chromogenen Peptidsubstrates S225I zeigt:

1. Der Plasminogen-Streptokinase-Komplex besitzt in einem 0,1-molaren Triäthanolaminpuffermilieu ein breites ph-Optimum mit maximalen Umsatzgeschwindigkeiten gegenüber S225I bei ph = 8,0. Entscheidende Beeinflussungen der Meßergebnisse sind durch Schwankungen des - auf ph = 8,0 eingestellten - ph-Wertes z.B. durch Bildung von Hydroniumionen während der Reaktion daher nicht zu erwarten.
2. Eine optimale Streptokinasekonzentration wird durch Aktivation mit 10.000 IE/ml erreicht. Hierbei wird in einer 1:4 verdünnten Normalplasmalösung bei einem Verhältnis von Plasminogen zu Streptokinase von 1:50 ausschließlich der estrolytisch aktive Plasminogen-

Streptokinase-Komplex gebildet. Dieses molare Verhältnis von Plasminogen zu Streptokinase entspricht damit annähernd den von Friberger gefundenen Optimalbedingungen mit einem Verhältnis von 1:40 (Lit.2). Besonders durch diesen Überschuß an Streptokinase in den Proben wird gewährleistet, daß das Enzym bzw. der gebildete Komplex ausschließlich das chromogene Substrat spaltet.

3. Durch eine zehnminütige bei 37°C erfolgende Inkubation im Wasserbad werden die Ansätze zuverlässig aktiviert, sodaß maximale und gut reproduzierbare Umsätze erreicht werden. Eine längere Inkubation oder ein anderer Temperaturbereich zeigt keine Vorteile. Eine wesentliche Änderung der Meßergebnisse durch zeitliche Verzögerung nach erfolgter Aktivierung, ist durch die große Stabilität der Ansatzaktivitäten nicht zu erwarten.
4. Durch Verwendung einer 8 mmol/l enthaltenden Substratlösung wird die Michaelis-Menten-Konstante um das Zehnfache überschritten. D.h. die Plasmaproben werden unter Substratsättigung bei maximaler Umsatzgeschwindigkeit gemessen. Eine Inhibition der Aktivitäten durch steigende Substratkonzentrationen wird nicht beobachtet. Das untersuchte Enzym-Substrat-System folgt somit den Gesetzen von Michaelis und Menten.
5. Unter Verwendung der ermittelten Optimalbedingungen für den Einsatz des S225I findet sich ein deutlich linearer Verlauf der Extinktionen in der gewählten Meßzeit. Zuverlässig findet sich dieser Umsatzverlauf für Plasmaverdünnungen zwischen 1:64 und 1:4. Die Extinktionsänderungen zeigen ebenfalls für Plasmaverdünnungen zwischen 1:64 und 1:4 einen sicheren linearen Verlauf. Die Auswahl der in den Test einzu-

setzenden Plasmakonzentrationen ist damit einfach. Oberhalb einer Verdünnung von 1:4 erreichen die Umsätze u.U. auch aufgrund eines Mißverhältnisses von Enzym und Substrat keine maximalen und damit auch nicht lineare Werte. Außerdem wird mit einer Extinktion von 3,5 in der Meßzeit von 140 sec der lineare Arbeitsbereich des Photometers überschritten.
Die Verwendung eines Normalplamapools und die Angabe der Meßwerte in Prozent der Poolplasmaaktivität ließ uns auf die Verwendung und Auswahl eine Plasminogenstandards verzichten. Anzunehmen ist hierbei, daß eventuell auftretende Inhibitionen oder andere störende Einflüsse auf die Meßergebnisse durch z.B. mit dem Enzym konkurrierende Plasmaproteine weitgehend ausgeglichen werden. Durch die Verwendung eines reinen Plasmin- oder Plasminogenstandards wäre dies nicht möglich gewesen.
Die Überprüfung der chromogenen Methode für ihren klinischen Einsatz erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten:

1. Spezifität
2. Richtigkeit
3. Präzision
4. Empfindlichkeit

ad 1: Nach Angaben des Herstellers ist das Pedtidsubstrat S225I für die Plasminogenbestimmung aufgrund seiner hohen Spezifität gegenüber diesem Plasmaprotein besonders geeignet. So erhalte man unter Verwendung von 10^{-11} mol Plasmin in einem 2,5 ml großen Ansatz eine Umsatzaktivität von 0.040 dE/min. Thrombin und Faktor Xa zeigen unter den gleichen Verhältnissen lediglich Umsätze von 0.002 bzw. 0.001 dE/min.

ad 2: Die Richtigkeit einer neuen Methode wird durch den Vergleich der mit ihr erhaltenen Meßwerte mit denen einer anerkannten Methode untersucht. Die für die beiden ausgewählten Spenderplasmakonzentrationen erhaltenen

Meßwerte in % der Normalplasmaaktivität zeigen bei der graphischen und statistischen Gegenüberstellung mit den parallel durchgeführten Messung nach dem Prinzip der Radialen Immundiffusion (mg/100 ml) einen deutlich linearen Zusammenhang bzw. einen linearen Korrelationskoeffizienten von ca. 0.80. Hierbei muß man berücksichtigen, daß der Vergleich einer immunologischen Methode mit einer funktionellen zwangsläufig das Problem funktionell inaktiver aber immunologisch meßbarer Proteine aufwirft. Auch der umgekehrte Fall ist denkbar. Wir halten daher das von uns gefundene Meßergebnis für signifikant.

ad 3: Mit Hilfe der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten erhalten wir für die an 12 aufeinander folgenden Tagen durchgeführten vergleichenden Messungen ein Maß für die Präzision der einander gegenüber gestellten Methoden.
Für die als Standards in den neuen Test eingesetzten Normalplasmaverdünnungen findet sich bei einer Standardabweichung 1.3 - 0.4 % ein Variationskoeffizient von durchschnittlich 1.4 %. Damit wird die hohe Präzision und Reproduzierbarkeit der chromogenen Methode deutlich. Die Referenzmethode hingegen zeigt deutlich größere Schwankungen mit einer Standardabweichung von 0.6 mg/100 ml und einem Variationskoeffizienten von 4.7 %.

ad 4: Die Empfindlichkeit beider Methoden ist ebenfalls aus der Standardabweichung ersichtlich. Sie ist definiert als deren zweifacher Betrag. Für die Normalplasmastandards beträgt dieser Wert 2.6 - 0.8 %. Die Methode ist damit deutlich empfindlicher als die Radiale Immundiffusion, deren Empfindlichkeitsbereich bei 1,2 mg pro 100 ml liegt.

Da die Spenderplasmen bzw. die in den Test einzusetzenden Patientenplasmen als 1:4 bzw. 1:8 Verdünnung gemessen werden sollten, liegt der hier relevante Empfindlichkeitsbereich bei 2.6 bzw. 1.4 %. Die Nachweisbarkeit der neuen Methode bzw. die untere Nachweisgrenze entspricht der Plasmakonzentration, die als niedrigste Verdünnung bzw. Konzentration des Normalplasmas noch gut reproduzierbare Werte liefert: Sie beträgt 1.6 % entsprechend einer 1:62,5 Verdünnung. Damit besitzt die vorgestellte chromogene Methode besonders im Hinblick auf Verlaufsbeobachtungen des Plasminogenspiegels unter Streptokinasetherapie bei guter Reproduzierbarkeit ausgezeichnete Eigenschaften.

7.0 Zusammenfassung

Es wird eine schnelle und gut reproduzierbare Methode zur Bestimmung der Plasminogenaktivität des menschlichen Plasmas mit Hilfe des chromogenen Peptidsubstrates H-D-Valyl-L-leucyl-L-lysin-p-nitroanilin Dihydrochlorid (S225I) vorgestellt. Das Zymogen Plasminogen des menschlichen Plasmas wird durch einen Überschuß von Streptokinase - einem Stoffwechselprodukt bestimmter Streptokokkenstämme - aktiviert. Der hierbei entstehende Plasminogen-Streptokinase-Komplex hat estrolytische Aktivität, die mit Hilfe des chromogenen Peptidsubstrates S225I gemessen werden kann. Das bei dieser Reaktion freigesetzte p-Nitroanilin wird bei 405 nm im Cobas-Bio-Zentrifugalanalysator kinetisch gemessen.

Die Richtigkeit der kinetischen Plasminaktivitätsbestimmung wurde mit Hilfe der quantitativen Plasminogenproteinbestimmung (Radiale Immundiffusion) kontrolliert. Die statistische Analytik der Meßwerte beider Methoden ergibt eine gute Vergleichbarkeit. Die hier vorgestellte Plasminogenaktivitätsbestimmung zeichnet sich durch sehr gute Reproduzierbarkeit, eine hohe Empfindlichkeit, sowie eine gute Automatisierbarkeit aus. Daher ist sie für den routinemäßigen Einsatz im klinisch-chemischen Labor geeignet.

8.0 Literaturverzeichnis

(Lit.1) : Fibrinolyse, Thrombose, Hämostase
Verhandlungen des I. Kongresses für Thrombose und Blutgerinnung; Wien, 21.-23. Feb. 1980
F.K. Schattauer/herausgeb. E. Deutsch K. Lechner

hier: N. Heimburger/Marburg

(Lit.2) : Plasminogen determination in human plasma

P. Friberger und M. Knös

(Lit.3) : Handbuch der experimentellen Pharmakologie
Vol. 46: Fibrinolytics and Antifibrinolytics
Springer 1978/F. Markwardt

(Lit.4) : A new specific substrate for determination of plasmin activity
P. Friberger, M. Knös, S. Gutavsson, L. Aurell und G. Claeson

(Lit.5) : Dissertation P. Kisly Düsseldorf

(Lit.6) : New Methods for the Analysis of Coagulation Using Chromogenic Substrates
I. Witt W. de Gruyter 1977

(Lit.7) : Centrifugal Analysers in Clinical Chemistry
H.G. Eisenwiener, J.M. Kindbreiter, M. Keller und K. Gütlin
Praeger Publishers 1980

(Lit.8) : A Fluorescent Substrate Assay for Plasminogen,
Sharon P. Pochron et al.
Thrombosis Research Vol. 13 pp. 733-739

(Lit.9) : Fibrinolytische Therapie/Medizin.Verlagsgesellschaft mbH Marburg/Schneider

(Lit.10): Untersuchungen zur koagulometrischen Plasminogenbestimmung/Collin 1976

(Lit.11): Gerinnungslaboratorium in Klinik und Praxis G. Thieme Leipzig 1971/Perlick

(Lit.12): Gerinnungsaktive Phospholipide Trobisch, H./Schwinn, H., Med. Welt Nr. 25 1604 1974

Lebenslauf:

LUCIEN C. OLIVIER

- 4.12.1957 geboren in Düsseldorf als 2. Kind der Eheleute Dr.rer.nat. Johannes Olivier und Erna Olivier geb. Krumbach. Konfession römisch-katholisch.

- 9. 4.1964 - 26. 7.1967
Besuch der Volksschulen in Düsseldorf-Pempelfort und in Meerbusch-Lank.

-22. 1.1968 - 13 6.1977
Besuch des Gymnasium Fabritianum in Krefeld-Uerdingen. Abschluß mit der allgemeinen Hochschulreife.

-WS 1977/78 Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Düsseldorf.

13.9.1979 ärztliche Vorprüfung
März 1980 Famulatur beim Staatlichen Gewerbearzt in Düsseldorf
15.9.1980 1. Staatsexamen
Sept.Okt. 1980 Famulatur in der Chirurgischen Abteilung des St. Dominikus-Krankenhauses in Düsseldorf-Heerdt bei Herrn Prof. Sykosch.
Febr.März April 1981 Famulatur in der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses in Grevenbroich bei Herrn Prof. Willmen.
2.9.1982 2. Staatsexamen

Oktober 1982 **Beginn des Praktischen Jahres**

-18.10.1982- 5.2.1983 **1. Pädiatrie** bei Herrn Dr. Haneke Chefarzt der Kinderklinik im St.Johannes-Hospital in Duisburg-Hamborn.

- 7. 2.1983-28.5.1983 **2. Innere Medizin** bei Herrn Dr. Kuhn Chefarzt der medizinsichen Klinik im St.Johannes-Hospital in Duisburg-Hamborn.

- 1. 6.1983-18.9.1983 **3. Chirurgie** im St.Mary's und Methodist Hospital der Mayo-Clinic in Rochester Minnesota U.S.A. bei:

Dr.L.Hollier	vascular surgery
Dr.P.Mucha	emergency room
Dr.R.Beart	colon surgery
Dr.C.Grant	"endocrine surgery"
Dr.P.Pairolero	thoracic and vascular surgery

- 8.11.1983 3. Staatsexamen

-18.11.1983 Eheschließung mit Gisela Olivier geb. Pochert.

-21.11.1983 Approbation zum Arzt

-19. 1.1984 Beginn der Weiterbildung zum Arzt für Chirurgie im Universitätsklinikum Essen.

Meerbusch, den 20. Januar 1984